

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Hans-Peter KRIMMER, et al.

GAU:

SERIAL NO: NEW APPLICATION

EXAMINER:

FILED: HEREWITH

FOR: PROCESS FOR THE PREPARATION OF ALLYSINE ACETAL

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
GERMANY	100 37 115.9	JULY 28, 2000

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Thomas Cunningham

Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

Thomas M. Cunningham, Ph.D.

Registration No. 45,394



22850



Docket No. 210740US0X

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

INVENTOR(S) Hans-Peter KRIMMER, et al.

SERIAL NO: New Application

FILING DATE: Herewith

FOR: PROCESS FOR THE PREPARATION OF ALLYSINE ACETAL

FEE TRANSMITTAL

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231



FOR	NUMBER FILED	NUMBER EXTRA	RATE	CALCULATIONS
TOTAL CLAIMS	11 - 20 =	0	× \$18 =	\$0.00
INDEPENDENT CLAIMS	1 - 3 =	0	× \$80 =	\$0.00
<input type="checkbox"/> MULTIPLE DEPENDENT CLAIMS (If applicable)			+ \$270 =	\$0.00
<input checked="" type="checkbox"/> LATE FILING OF DECLARATION			+ \$130 =	\$130.00
BASIC FEE				\$710.00
TOTAL OF ABOVE CALCULATIONS				\$840.00
<input type="checkbox"/> REDUCTION BY 50% FOR FILING BY SMALL ENTITY				\$0.00
<input type="checkbox"/> FILING IN NON-ENGLISH LANGUAGE			+ \$130 =	\$0.00
<input type="checkbox"/> RECORDATION OF ASSIGNMENT			+ \$40 =	\$0.00
TOTAL				\$840.00

- ☐ Please charge Deposit Account No. 15-0030 in the amount of A duplicate copy of this sheet is enclosed.
- ☒ A check in the amount of **\$840.00** to cover the filing fee is enclosed.
- ☒ The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees which may be required for the papers being filed herewith and for which no check is enclosed herewith, or credit any overpayment to Deposit Account No. 15-0030.
A duplicate copy of this sheet is enclosed.

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Thomas Cunningham
Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

Thomas M. Cunningham, Ph.D.

Registration No. 45,394



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/00)



1c996 U.S. PTO

09/916501



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 37 115.9
Anmeldetag: 28. Juli 2000
Anmelder/Inhaber: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main/DE
Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von L-Allysinacetal
IPC: C 12 P 13/04

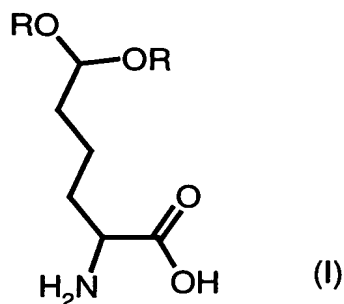
Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 31. Mai 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hiebinger

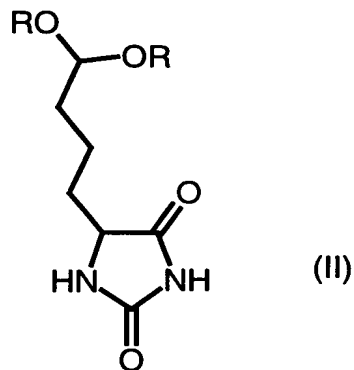
Verfahren zur Herstellung von L-Allysinacetal

Die vorliegende Erfindung ist auf die Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



5

gerichtet. Insbesondere werden diese Verbindungen mittels eines enzymatischen Verfahrens aus Hydantoinen der allgemeinen Formel (II)



10

hergestellt.

Verbindungen der Formel (I) sind geeignete Zwischenprodukte zur Herstellung von in der US 5552397, WO 9738705 und in J. Med. Chem. 42, 305 (1999) beschriebenen Pharmazeutika.

15 In J. Med. Chem. 42, 305 (1999) ist eine Syntheseroute zur Herstellung eines Bausteins - ein α -Amino- ϵ -caprolactamderivat - der pharmazeutisch wirksamen Verbindungen erwähnt. Dieses wird mit Hilfe teurer Reagenzien in

einem für einen robusten technischen Prozeß eher nachteiligen Verfahren gewonnen.

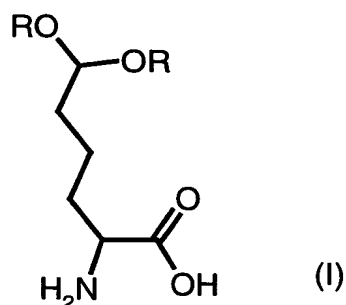
Aus JP 99206397 ist die Herstellung von Verbindungen wie (I) aus Hydantoinen wie (II) mittels *Athrobacter* sp. bereits bekannt. Dort wird jedoch nicht die vorteilhafte Racemisierung beschrieben.

Die Umsetzung von Hydantoinen mittels Hydantoinasen und spezifischen Carbamoylasen ist aus der DE19529211.1 bereits bekannt. Die spontane chemischen Racemisierung von Hydantoinen zur Herstellung von enantiomer angereicherten Aminosäuren ist aus der DE-P4137581.5-44 zu entnehmen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war deshalb die Angabe eines weiteren enzymatisch arbeitenden Verfahrens zur Herstellung der gewünschten Verbindungen. Insbesondere sollte dieses Verfahren einfacher in der Durchführung und damit für die Anwendung in einem großtechnischen Prozeß besser geeignet sein.

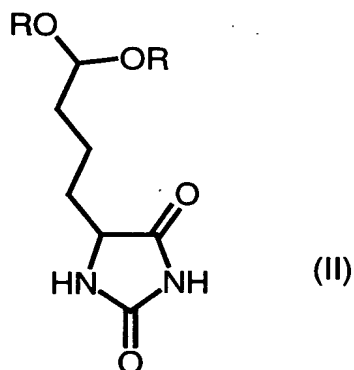
Diese und näher angeführte weitere, sich aus dem Stand der Technik jedoch in naheliegenderweise erschließende Aufgaben werden gelöst durch die Angabe eines Verfahrens mit den Merkmalen des vorliegenden Anspruchs 1. Vorteilhafte Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in den von Anspruch 1 abhängigen Unteransprüchen unter Schutz gestellt. Eine vorteilhafte Verwendung stellt Anspruch 6 unter Schutz.

Dadurch, daß man in einem Verfahren zur Herstellung von Al-
lysinacetal der allgemeinen Formel (I)



5

von Hydantoinen der allgemeinen Formel (II)



10

worin in den Formeln (I) und (II) R bedeutet (C₁-C₈)-Alkyl,
(C₂-C₄)-Alkylenyl, vorzugsweise Ethylenyl, (C₆-C₁₈)-Aryl,
(C₇-C₁₉)-Aralkyl, (C₁-C₈)-Acyl, ausgeht, wobei letztere ei-
ner Umsetzung mit Hydantoinasen und D- oder L-spezifischen
15 Carbamoylasen, sowie einer spontanen und/oder enzymkataly-
sierten in-situ Razemisierung unterworfen werden, und wobei
die beteiligten Enzyme in freier, immobilisierter oder in
Zellen eingeschlossener Form verwendet werden können, ge-
langt man in überraschender für einen großtechnischen Pro-
20 zeß jedoch vorteilhafterweise zu den gewünschten Verbindun-
gen wie (I).

Die erfindungsgemäße Reaktionssequenz wurde bis dato im Stand der Technik noch nicht auf die vorliegenden Verbindungen angewandt. Mithin ist es als überraschend zu werten, daß die labile acetalische Schutzgruppe unter den Reaktionsbedingungen stabil ist und man in sehr hohen Ausbeute aus 100% des Hydantoins in 85% Gesamtausbeute das Allylsinacetal generieren kann, welches eine optische Reinheit von >99% ee besitzt.

Wie gesagt kann das erfindungsgemäße Verfahren teilenzymatisch oder vollständig enzymatisch durchgeführt werden. Neben der Anwendung der freien Enzyme in einem Reaktionsansatz ist allerdings ein Verfahren besonders bevorzugt, bei dem ein sogenannter Ganzzellkatalysator, welcher ein kloniertes Gen codierend für eine Hydantoinracemase, eine Hydantoinase und eine L- oder D-spezifische Carbamoylase aufweist, eingesetzt wird. Derartige Organismen sind prinzipiell aus der US 60/157427 oder US 09/407062 (Seq. 1/Hydantoinase, 2/Hydantoinracemase, 3/Carbamoylase) bekannt. Die Offenbarung dieser Schriften gilt hiermit als mitumfaßt, insbesondere die Offenbarung der relevanten Aminosäuresequenzen in den Sequenzprotokollen. Dies gilt insbesondere für die US 60/157427.

Ganz besonders vorteilhaft ist der Einsatz eines Ganzzellkatalysators aufweisend eine L-spezifische Carbamoylase. Damit läßt sich die gewünschte optische Antipode des Allylsinacetal zur Herstellung der pharmazeutisch wirksamen Substanzen gewinnen.

Im Prinzip kann der Ganzzellkatalysator jedwedes geeignete Expressionssystem sein, welches dem Fachmann für diesen Zweck in Frage kommt. Besonders bevorzugt ist allerdings ein rekombinantes Bakterium, vorzugsweise E. coli, für die Aufgabe heranzuziehen. Vorteilhafte E. coli-Stämme sind: JM109, NM 522, JM105, RR1, DH5 α , TOP 10⁻ oder HB101.

Zur Ausführung der Erfindung geht man im allgemeinen so vor, daß man das Substrat (II) in einem geeigneten Lösungs-

mittel, vorzugsweise Wasser, bei einem für die Hydantoinase und Carbamoylase optimalen pH-Wert bei ca. 5,5-8,5, vorzugsweise 6,5-8, und einer für die Enzymaktivität optimalen Temperatur von ca. 20°C-40°C, vorzugsweise 25°C-35°C, mit
5 den Enzymen kontaktiert. Vorteilhaft kann die Zugabe von die Enzymaktivitäten positiv beeinflussenden Metallsalzen, wie CoCl_2 oder MgCl_2 , MnCl_2 etc. sein.

Während der Spaltung der Hydantoine in die optisch angereicherten Aminosäuren racemisieren die Hydantoine spontan. Um
10 diese Reaktion jedoch zu beschleunigen kann das verbliebene Hydantoin in situ enzymatisch racemisiert werden und steht damit der erneuten Spaltung in die Aminosäure zur Verfügung. Vorzugsweise wird deshalb aus zeitgründen eine enzymatische Racemisierung angestrebt, die gleichzeitig mit der
15 Umsetzung des Hydantoins zur Aminosäure verläuft. So kann in einem Arbeitsschritt das gesamte Hydantoin in die Aminosäure umgesetzt werden. Dies kann wie gesagt mit separat zur Verfügung stehenden Enzymen, welche frei oder immobilisiert vorliegen können oder mit einem in einem Mikroorganismus eingeschlossenen Enzymen erfolgen (US 60/157427).
20 Das erfindungsgemäße Verfahren kann in sequentiellen Reaktionsansätzen oder kontinuierlich in einem sogenannten Enzym-Membran-Reaktor durchgeführt werden (Wandrey et al. in Jahrbuch 1998, Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen, VDI S. 151ff.; Kragl et al. Angew. Chem. 1996, 6, 684f.).
25

In einer weiteren Ausgestaltung bezieht sich die Erfindung auf eine Verwendung der erfindungsgemäß hergestellten Acetale in einer Synthese zur Herstellung von bioaktiven Wirkstoffen, insbesondere von Pharamzeutika.

30 Als $(\text{C}_1\text{-C}_8)$ -Alkyl sind anzusehen Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, Isopropyl, *n*-Butyl, Isobutyl, *sec*-Butyl, *tert*-Butyl, Pentyl, Hexyl, Heptyl oder Octyl samt aller ihrer Bindungsisomeren.

Als (C_1-C_8) -Alkylenyl sind gemeint Alkylbrücken mit 2 bis 8 C-Atomen, wobei in 1 und n-Stellung jeweils die Substituenten sitzen, wie z.B. Ethylenyl, Propylenyl etc.

5 Unter einem (C_6-C_{18}) -Arylrest wird ein aromatischer Rest mit 6 bis 18 C-Atomen verstanden. Insbesondere zählen hierzu Verbindungen wie Phenyl-, Naphthyl-, Anthryl-, Phenanthryl-, Biphenylreste.

Ein (C_7-C_{19}) -Aralkylrest ist ein über einen (C_1-C_8) -Alkylrest an das Molekül gebundener (C_6-C_{18}) -Arylrest.

10 Ein (C_1-C_8) -Acylrest bezeichnet einen (C_1-C_8) -Alkylrest, welcher über eine C=O-Funktion an das Molekül gebunden ist.

Die gezeigten Strukturen der Verbindungen beziehen sich auf beide optische Isomere.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls Aktiengesellschaft

5 <120> Verfahren zur Herstellung von L-Allylsinacetal

<130> 000389 AM

<140>

10 <141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1376

<212> DNA

<213> Arthrobacter aurescens

20

<400> 1

	atgtttgacg	taatagttaa	gaactgccgt	atggtgtcca	gcgacggaat	caccgaggca	60
	gacattcttg	tgaaagacgg	caaagtcgcc	gcaatcagcg	cggacacacg	tgatgtcgag	120
	gccagccgaa	ccattgacgc	gggtggcaag	ttcgtgatgc	cgggcgtggt	cgatgaacat	180
25	gtgcatatca	tcgacatgga	tctcaagaac	cggtatggcc	gcttcgaact	cgattccgag	240
	tctgcggccg	tgggagggcat	caccaccatc	atcgagatgc	cgatcacctt	ccccaccacc	300
	accactcttg	acgccttcct	tgaaaagaag	aagcaggcgg	ggcagcggtt	gaaagttgac	360
	ttcgcgctct	atggaggtgg	agtgcgggga	aacctgcccg	agatccgcaa	aatgcacgac	420
	gccggcgctg	tgggcttcaa	gtcaatgatg	gcagcctcag	tgccggggcat	gttcgacgcc	480
30	gtcagcgacg	gcgaactggt	cgaaatcttc	caagagatcg	cagcctgtgg	ttcagtcac	540
	gtggttcatg	ccgagaatga	aacgatcatt	caagcgctcc	agaagcagat	caaggccgct	600
	ggcggcaagg	acatggccgc	ctacgaggca	tccaacccag	ttttccagga	gaacgaggcc	660
	attcagcgctg	cgttgcttct	gcagaaagaa	gccggctgtc	gactgatcgt	gcttcacgtg	720
	agcaaccctg	acggcgctcg	gttaatacat	caggcgcaat	ccgagggtca	ggacgtccac	780
35	tgcgagtcgg	gtccgcagta	tctgaatatc	accacggacg	acgccgaacg	aatcggaccg	840
	tatatgaagg	tcgcgccgcc	cgcccgctca	gccgaaatga	acgtcagggt	atgggaacaa	900
	ctcgagaacg	gtgtcatcga	cacccttgga	tcagatcatg	gcggacatcc	tgtcgaggac	960
	aaagaacccg	gctggaagga	cgtgtggaaa	gccggcaacg	gtgcgctggg	ccttgagaca	1020
	tccctgccta	tgatgctgac	caacggagtg	aacaagggca	ggctatcctt	ggaacgcctc	1080
40	gtcgaggtga	tgtgcgagaa	acctgcgaag	cttttttggt	tctatccgca	gaagggcacg	1140
	ctacaggttg	gttccgacgc	cgatctactc	atcctcgatc	tggacattga	caccaaagtg	1200
	gatgcgctgc	agttccgac	cctgcataag	tacagcccgt	tcgacgggat	gcccgtcacg	1260
	ggtgcaccgg	ttctgacgat	ggtgcgcgga	acggtgggtg	ccgagcaggg	agaagttctg	1320
45	gtcgagcagg	gattcggcca	gttcgtcacc	cgtcaccact	acgaggcgtc	gaagtga	1377

<210> 2

<211> 711

<212> DNA

50 <213> Arthrobacter aurescens

<400> 2

	atgagaatcc	tcgtgatcaa	ccccaacagt	tccagcgccc	ttactgaatc	ggttgcggac	60
	gcagcacaac	aagttgtcgc	gaccggcacc	ataatttctg	ccatcaaccc	ctccagagga	120
55	cccgcggtca	ttgaaggcag	ctttgacgaa	gcaactggcca	cgttccatct	cattgaagag	180
	gtggagcgcg	ctgagcggga	aaacccgccc	gacgcctacg	tcatcgcatg	tttcggggat	240
	ccgggacttg	acgcgggtcaa	ggagctgact	gacaggccag	tggtaggagt	tgccgaagct	300
	gcaatccaca	tgtcttcatt	cgtcgcggcc	accttctcca	ttgtcagcat	cctcccagg	360
	gtcaggaaac	atctgcacga	actggtacgg	caagcggggg	cgacgaatcg	cctcgccctc	420

atcaagctcc caaatctggg ggtgatggcc ttccatgagg acgaacatgc cgcactggag 480
 acgctcaaac aagccgcaa ggaggcggtc caggaggacg gcgccgagtc gatagtgtc 540
 ggatgcgccg gcatgggtgg gtttgcgcgt caactgagcg acgaactcgg cgtccctgtc 600
 atcgaccccg tcgaggcagc ttgccgcgtg gccgagagtt tggtcgctct gggctaccag 660
 5 accagcaaag cgaactcgta tcaaaaaccg acagagaagc agtacctcta g 711

<210> 3

<211> 1239

10 <212> DNA

<213> *Arthrobacter aurescens*

<400> 3

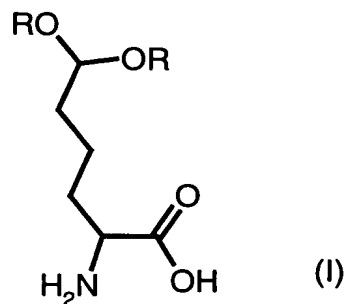
15 atgaccctgc agaaagcgca agcggcgcgcg attgagaaag agatccggga gctctcccgg 60
 ttctcggcag aaggccccgg tgttaccggg ctgacctaca ctccagagca tgccgcgcgg 120
 cgggaaacgc tcattgcggc tatgaaagcg gccgccttga gcgttcgtga agacgcactc 180
 ggaaacatca tcggccgacg tgaaggcact gatccggagc ttcttgcgat cgcgggtcgg 240
 tcacacttcg attctgtccg aaacggcggg atgtttgatg gcaactgcagg cgtgggtgtg 300
 gcccttgagg ctgcccgggt gatgctggag aacggctacg tgaatcggca tccatttgag 360
 20 ttcacgcgca tcgtggagga ggaagggggc cgcttcagca gtggcatgtt gggcgggccg 420
 gccattgcag ggttggtcgc cgacagggaa ctggactctt tggttgatga ggatggagtg 480
 tccgttaggc aggcggctac tgccttcggc ttgaagccgg gcgaactgca ggctgcagcc 540
 cgctccgcgg cggacctgcg tgcttttata gaactacaca ttgaacaagg accgatcctc 600
 gagcaggagc aaatagagat cggagttgta acctccatcg ttggcggtcg cgcattgcgg 660
 25 gttgccgtca aaggcagaag cgaccacgcc ggcacaaccc ccatgcacct gcgccaggat 720
 gcgctggtac ccgccgctct catggtgagg gaggtcaacc ggttcgtcaa cgagatcgcc 780
 gatggcacag tggctaccgt tggccacctc acagtggccc ccggtggagg caaccaggtc 840
 ccggggggagg tggacttcac actggacctg cgttctccgc atgaggagtc gctccgcgtg 900
 ctgatcgacc gcactctcgg catggtcggc gaggtcgcct cccaggccgg tgtggctgcc 960
 30 gatgtggatg aatttttcaa tctcagccc gtgcagctgg ctctaccat ggtggacgcc 1020
 gttcgcgaaag cggcctcggc cttgcagttc acacaccggg atatcagcag tggggcgggc 1080
 cagcactcga tgttcacgc ccaggtcacg gacgtcggaa tggttttcgt tccaagccgt 1140
 gctggccgga gccacgttcc cgaagaatgg accgatttcg atgaccttcg caaaggaact 1200
 35 gaggttgtcc tccgggtaat gaaggcactt gaccggtaa 1239

Beispiel:

30g (Naßgewicht) E.coli-Zellen JM109 (pOM22, pOM21) (US
60/157427) wurden zusammen mit 100 mM DL-Allylsinhydantoin
und 1mM CoCl₂ bei pH 7.8 in 1l Wasser vermischt. Die Reak-
5 tionsmischung wurde anschließend bei 37°C für 4 h belassen.
Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (45 min, 8000 rpm,
4°C, Beckman Coulter JA-10 rotor) und der Überstand mittels
HPLC analysiert. Man erhielt nach 4 h eine Ausbeute an L-
Allylsinacetal von >85% mit einer optischen Reinheit von
10 >99%ee.

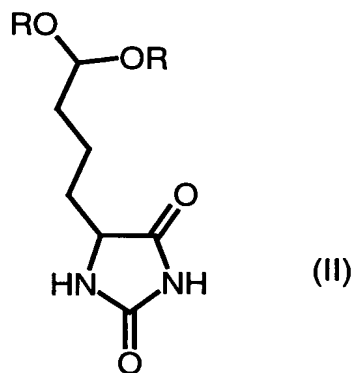
Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Allysinacetal der allgemeinen Formel (I)



5

ausgehend von Hydantoinen der allgemeinen Formel (II)



10

worin in den Formeln (I) und (II) R bedeutet (C₁-C₈)-Alkyl, (C₂-C₄)-Alkylen, (C₆-C₁₈)-Aryl, (C₇-C₁₉)-Aralkyl, (C₁-C₈)-Acyl,

15

durch Umsetzung mit Hydantoinasen und D- oder L-spezifischen Carbamoylasen, sowie einer spontanen und/oder enzymkatalysierten in-situ Racemisierung, wobei die beteiligten Enzyme in freier, immobilisierter oder in Zellen eingeschlossener Form verwendet werden können.

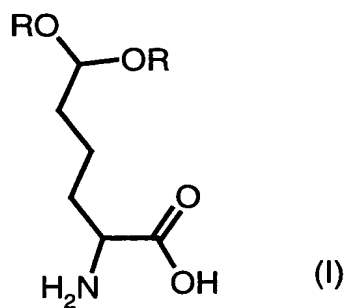
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

man einen Ganzzellkatalysator, welcher ein kloniertes Gen codierend für eine Hydantoinracemase, eine Hydantoinase und eine L- oder D-spezifische Carbamoylase aufweist, einsetzt.

- 5 3. Verfahren nach Anspruch 2,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 der Ganzzellkatalysator eine L-spezifische Carbamoylase aufweist.
- 10 4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und/oder 3,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 der Ganzzellkatalysator ein rekombinantes Bakterium,
 vorzugsweise E. coli, ist.
- 15 5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden
 Ansprüche,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 man in einem Enzym-Membran-Reaktor arbeitet.
- 20 6. Verwendung der nach einem der vorhergehenden Ansprüche
 hergestellten Acetale in einer Synthese zur Herstellung
 von bioaktiven Wirkstoffen, insbesondere von Pharmazeutika.

Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung von Verbindungen der Formel (I)



5

aus den entsprechenden Hydantoinen mittels eines enzymatischen Verfahrens. Vorzugsweise wird die L-Verbindung gebildet.